

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-102492

(43)Date of publication of application : 08.04.2003

(51)Int.Cl.

C12P 7/26
C07C 29/143
C07C 35/16
C12N 1/20
C12P 7/18
// (C12N 1/20
C12R 1:38)
(C12N 1/20
C12R 1:02)
(C12P 7/18
C12R 1:38)
(C12P 7/18
C12R 1:02)
(C12P 7/26
C12R 1:38)
(C12P 7/26
C12R 1:02)

(21)Application number : 2002-184912

(71)Applicant : HOKKO CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 25.06.2002

(72)Inventor : KANBE KENJI
TAKAHASHI ATSUSHI
KITA YUICHI
YAMAGUCHI MASANORI
TAMAMURA TAKESHI
MORI TETSUYA

(30)Priority

Priority number : 2001191161 Priority date : 25.06.2001 Priority country : JP

(54) METHOD OF PRODUCING SCYLLO-INOSEO AND METHOD OF PRODUCING SCYLLO-INOSITOL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of producing scyllo-inosose that is high useful as a raw material for medicines from inexpensive myo-inositol and a method of producing scyllo-inositol by reducing scyllo-inosose chemically by using a microorganism.

SOLUTION: A microorganism, Pseudomonas sp. AB10064 strain (FERM P-18330) or Acetobactor sp. AB10253 strain (FERM P-18868), is allowed to act on myo-inositol to convert to scyllo-inosose. After scyllo-inosose is produced according to the process described, a reductant is allowed to act on the reaction mixture including scyllo-inosose without isolation of the scyllo-inosose formed to produce myo-inositol and scyllo-inositol. According to this invention, the scyllo-inosose of high purity useful as a raw material for medicines, agrochemicals and the scyllo-inositol useful as a raw material for synthesizing medicines, agrochemicals can be inexpensively produced.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.07.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-102492

(P2003-102492A)

(43) 公開日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51)Int.Cl.' C 1 2 P 7/26 C 0 7 C 29/143 35/16 C 1 2 N 1/20 C 1 2 P 7/18	識別記号	F I C 1 2 P 7/26 C 0 7 C 29/143 35/16 C 1 2 N 1/20 C 1 2 P 7/18	テームコード(参考) 4 B 0 6 4 4 B 0 6 5 4 H 0 0 6 A
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2002-184912(P2002-184912)	(71)出願人	000242002 北興化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号
(22)出願日	平成14年6月25日(2002.6.25)	(72)発明者	神辺 健司 神奈川県横浜市青葉区みたけ台7番地16
(31)優先権主張番号	特願2001-191161(P2001-191161)	(72)発明者	高橋 篤 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25-201号
(32)優先日	平成13年6月25日(2001.6.25)	(74)代理人	100066452 弁理士 八木田 茂 (外2名)
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シロ-イノソースの製造法及びシロ-イノシトールの製造法

(57) 【要約】

【課題】 微生物を利用して、安価なミオ-イノシトールから医薬品その他の原料として利用価値の高いシロ-イノソースを製造する方法と、シロ-イノソースを化学的に還元してシロ-イノシトールを効率よく製造する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明では、ミオ-イノシトールにシュ-ードモナス・エスピーAB10064株 (FERM P-18330) あるいはアセトバクター・エスピーAB10253株 (FERMP-18868) を作用させて、ミオ-イノシトールをシロ-イノソースへ変換させることを特徴とする、シロ-イノソースの製造方法と、上記の方法でシロ-イノソースを生成させた後に、生成したシロ-イノソースを単離することなしに、シロ-イノソースを含有する反応液に還元剤を作用させてシロ-イノシトールをおよびミオ-イノシトール生成させることを特徴とするシロ-イノシトールの製造方法とが開発された。本発明の方法によれば、医薬品合成原料として有用な、純度の高いシロ-イノソースと、医薬及び医薬品合成原料として有用なシロ-イノシトールを、工業的生産レベルで安価に製造することがで

きる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミオーイノシトールに、細菌であるシュードモナス・エスピーAB10064株（FERM P-18330として寄託）あるいはアセトバクター・エスピーAB10253株（FERM P-18868として寄託）を作用させて、ミオーイノシトールをシロイノソースへ変換させることを特徴とする、シロイノソースの製造方法。

【請求項2】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオーイノシトールに該細菌を作用させて、ミオーイノシトールをシロイノソースへ変換させ、これにより、培養液中でシロイノソースを生成させかつ蓄積させ、そして、培養液からシロイノソースを回収する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から得られた菌体或いはその破砕物を、ミオーイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーイノシトールに作用させて前記の水溶液または緩衝液中でシロイノソースを生成させ、そして生成したシロイノソースを回収する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法でシロイノソースを生成させ、得られた反応液から生成したシロイノソースを単離することなしに、シロイノソースを含有する該反応液に還元剤を添加して作用させてシロイノソースからシロイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させることを特徴とする、シロイノシトールの製造方法。

【請求項5】 請求項4に記載の方法でシロイノソースを還元してシロイノシトールとミオーイノシトールを生成させ、生成されたシロイノシトールおよびミオーイノシトールを含む反応液に、再度、AB10064株あるいはAB10253株を作用させることにより、反応液中に存在するシロイノシトールには何ら影響を与えずに、シロイノシトールと同時に生成したミオーイノシトールをシロイノソースへ変換し、得られた反応液に次に還元剤を添加してシロイノソースからシロイノシトールおよびミオーイノシトールを再び生成させることにより、反応液中のシロイノシトールの含有量を高める、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法でシロイノソースを還元した際に生成するミオーイノシトールを、AB10064株あるいはAB10253株で再びシロイノソースへ変換する工程を数回繰り返して実行し、得られた反応液に次に還元剤を添加して、シロイノソースからシロイノシトールを生成させることにより、反応液中のシロイノシトールの濃度を段階的に高める、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオー

イノシトールに当該細菌を作用させて、ミオーイノシトールをシロイノソースに変換することにより培養液中でシロイノソースを生成させかつ蓄積させ、得られた反応液からシロイノソースを単離することなしに、シロイノソースを含有する該反応液に次に還元剤を直接に添加して、該還元剤をシロイノソースに作用させてシロイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させ、そして得られた反応液からシロイノシトールを回収する、請求項4に記載の方法。

10 【請求項8】 請求項7に記載の方法で、シロイノソースから還元剤でシロイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させた反応液に、再度、AB10064株あるいはAB10253株を作用させることにより反復回分で培養を実施して、反応液中に生成したミオーイノシトールをシロイノソースへ変換し、この反応液に還元剤を直接に添加して該還元剤をシロイノソースに作用させてシロイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させることにより、反応液中のシロイノシトールの含有量を高め、こうして得られた反応液からシロイノシトールを回収する、請求項7に記載の方法。

20 【請求項9】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から得られた菌体或いはその破砕物を、ミオーイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーイノシトールと反応させて前記の水溶液または緩衝液中でシロイノソースを生成せしめ、得られた反応液から生成したシロイノソースを単離することなしに、シロイノソースを含有する該反応液に還元剤を直接に添加し、該還元剤をシロイノソースに作用させてシロイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させ、そして生成したシロイノシトールを回収する、請求項4に記載の方法。

30 【請求項10】 ミオーイノシトールをシロイノソースに選択的に変換できる特性を有して独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERMP-18330の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスピーAB10064株。

40 【請求項11】 ミオーイノシトールをシロイノソースに選択的に変換できる特性を有して独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERMP-18868の受託番号で寄託されたアセトバクター・エスピーAB10253株。

【発明の詳細な説明】

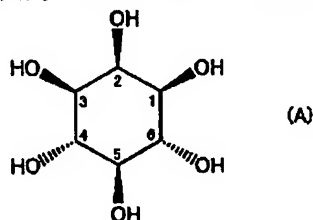
【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自然界から新たに本発明者らが分離したシュードモナス属細菌AB10064株あるいはアセトバクター属細菌AB10253株を新規な微生物として利用し、安価なミオーイノシトール（myo-Inositol）から、医薬品その他の原料として利用価値の高いシロイノソース（scyllo-Inosose）を製造する方法に関する。また、本発明はミオーイノシトールから得

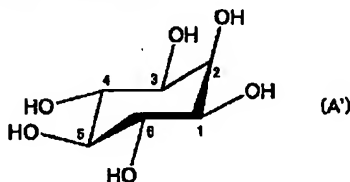
たシロ-イノソースを化学的に還元して、アルツハイマー病の治療薬 (The Journal of Biological Chemistry, 第275巻No.24, 第18495~18502頁、2000年) や、生理活性物質の合成原料 (米国特許第5,412,080号明細書)、液晶化合物の合成原料 (ドイツ連邦共和国公開特許第3,642,999号公報) としての用途が期待されているシロ-イノシトール (scyllo-Inositol) を効率よく製造する方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】 ミオ-イノシトールは次の平面式 (A)



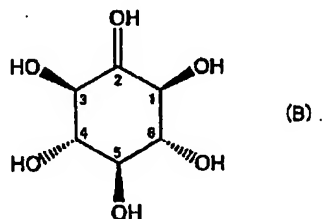
または次の立体構造式 (A')



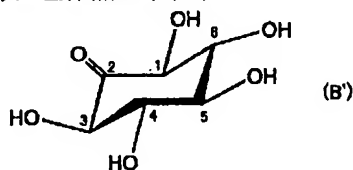
で表される天然に産する既知の物質である。

【0003】 また、シロ-イノソースは次の平面式

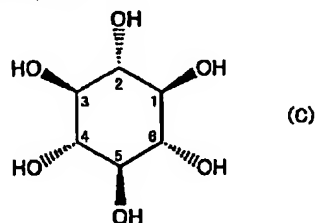
(B)



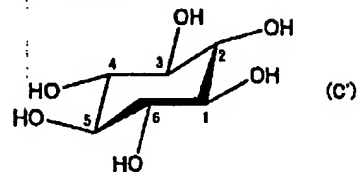
または次の立体構造式 (B')



で表される既知の化合物である。さらに、シロ-イノシトールは次の平面式 (C)



または次の立体構造式 (C')



で表される既知の化合物である。

【0004】 シロ-イノシトールはミオ-イノシトールの立体異性体の一つで、動物・植物中に広く見出される物質である。また、シロ-イノソースはミオ-イノシトールの2位のアキシャルな水酸基が酸化された構造を有する化合物でこれも天然物として普遍的に存在する。

【0005】 ミオ-イノシトールを酸化してシロ-イノソースへ変換する酵素 (ミオ-イノシトールデヒドロゲナーゼ) は自然界に広く存在する酵素であり、動物、藻類、酵母、細菌等、多くの生物種からのものについて報告がある。上記酵素を有する代表的な微生物種としては、グルコノバクター属細菌 (Helvetica Chimica Acta, 第24巻, 第1045~1058頁, 1941年及びJournal of Organic Chemistry, 第26巻, 第912~918頁, 1961年等)、バチルス属細菌 (特開平4-126075号公報)、シュードモナス属細菌等 (Monatshefte für Chemie, 第100巻, 第1327~1337頁, 1969年及びJournal of Bacteriology, 第131巻, 第872~875頁, 1977年) がある。なお、グルコノバクター属細菌を記載する前記のHelvetica Chimica Acta, 第24巻, 第1045~1058頁 (1941年) 及びJournal of Organic Chemistry, 第26巻, 第912~918頁 (1961年) 等の論文中にはAcetobacter oxydansあるいは

30 はAcetobacter suboxydansと記載されているが、これらの菌株はその後Gluconobacter属として再分類され、Barclay's Manual of Determinative Bacteriology第8版 (1974年) から以降はGluconobacter属に移されている。

【0006】 また、ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールへ変換できる微生物としてはアグロバクテリウム属細菌が知られている (特開平9-140388号公報)。

【0007】 一方、化学合成的手法でシロ-イノソースまたはシロ-イノシトールを製造する方法としては、①ヘキサヒドロキシベンゼンをラネイニッケルで還元し、シロ-イノシトールを得る方法 (Journal of the American Chemical Society, 70巻, 293頁, 1948年) ; ②グルコフラノース誘導体から5段階の反応でシロ-イノソースを得た後、還元して、シロ-イノシトールを得る方法 (Journal of the American Chemical Society, 第90巻, 第3289~3290頁, 1968年) ; ③シス-トリオキサートリス-ホモベンゼンを原料に4段階以上の反応でシロ-イノシトールを得る方法 (Anwander Chemie, 第85巻, 第1110~1111頁, 1973年) ; ④ミオ-イノシトールを白金触媒で酸化してシロ-イノソースを得、続いてエ

50 ステル化した後、還元と加水分解を行って、シロ-イノ

シトールを得る方法（ドイツ連邦共和国公開特許第3,405,663号公報）等がある。

【0008】以上のように、ミオーイノシトールを微生物により酸化してシロイノソースを生成する方法、及び、シロイノソースを適当な還元剤で還元してシロイノシトールを生成する方法は公知の技術である。

【0009】しかしながら、これら既知のシロイノソース及びシロイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で実施する方法としては、使用される微生物の変換活性が弱く、また操作の煩雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、これらの従来法は全て必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率よくシロイノソースを製造する方法、及びシロイノシトールを製造する方法が要望されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高純度のシロイノソースを効率よく製造できる新しい方法及びシロイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、本発明者らが自然界より新たに分離した、シュードモナス属細菌と同定されてAB10064の菌株番号を付与された新菌株の細菌を、ミオーイノシトールに作用させると、ミオーイノシトールからシロイノソースを選択的に高収率で生成させ得る選択的な酸化の活性をもつことを見出した。また、同様な活性が別個に分離されたアセトバクター属細菌と同定されてAB10253の菌株番号を付与された菌株にも見出された。

【0012】本発明者らの研究によれば、ミオーイノシトールと通常の炭素源及び窒素源とを含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーイノシトールと窒素源とを含有する液体培地で上記のシュードモナス・エスピーAB10064株あるいはアセトバクター・エスピーAB10253株を好気的に培養して、これにより得られた培養液中で、ミオーイノシトールからシロイノソースを生成させ且つシロイノソースを高い含有量で蓄積させるようにしてシロイノソースの新しい製造法を本発明で実施できる。また、本発明のシロイノソースの新しい製造方法では、培養液中にまたは水性媒質中に高い含有量で蓄積したシロイノソースは、これに何ら化学的処理を施さずに、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等を使用するイオン交換樹脂処理あるいは活性炭処理あるいは晶析操作にかけることにより、あるいはこれらの処理の組合せにかけることにより、高純度なシロイノソースとして、効率よく回収するようにして実施できる。

【0013】さらに、本発明者らが別途の研究を行った

結果、上記の培養液中に蓄積されたシロイノソースは、培養液から菌体を除去した後、得られた培養上清液に直接、適当な量の水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を添加して、培養上清液中で上記シロイノソースに該還元剤を反応させた場合には、シロイノソースはシロイノシトールに効率よく還元されることが、およびミオーイノシトールが副生されることが知見された。すなわち、培養上清液中のシロイノソースは、該上清液から単離されなくとも、上記還元剤との反応により培養上清液内でシロイノシトールに効率よく還元され得ることが見出された。また、このとき、シロイノシトールの生成と同時にミオーイノシトールも副成することが見出された。こうして得られた還元反応液に対して、還元反応前に培養液から除去したAB10064株の菌体あるいはAB10253株を再度添加し、酵母エキス等の適当な栄養源と共に反復回分培養を実施すると、還元反応液中のシロイノシトールには全く影響を与えずに、副成したミオーイノシトールのみをシロイノソースへ変換する酸化反応が進行することが判明した。更に、この酸化の反応液

（培養液）から除菌し、さらにその培養上清液に再度、還元剤を添加し、シロイノソースを還元すると、ここで得られた還元反応液中のシロイノシトールの含量が増大し、従って、このように行われた方法は効率的なシロイノシトールの製造方法として非常に有効な手段であることを知見した。この微生物的酸化反応と化学的還元反応は、繰り返し実施することで更に反応液または培養液（または培養上清液）中のシロイノシトールの含有量を増大させることが可能であることも知見した。

【0014】従って、第1の本発明においては、ミオーイノシトールに、細菌であるシュードモナス・エスピーAB10064株（FERM P-18330として寄託）あるいはアセトバクター・エスピーAB10253株（FERM P-18868として寄託）を作用させて、ミオーイノシトールをシロイノソースへ変換させることを特徴とする、シロイノソースの製造方法が提供される。

【0015】適当な精製方法、例えばイオン交換樹脂処理、あるいは晶析等あるいはこれらの組合せにかけることにより、上記の方法で得られた反応液または培養上清液から効率よくシロイノソースを回収することができる。

【0016】第1の本発明の方法は、具体的には以下に示す（A）及び（B）の2つの実施方法で行うことができる。

【0017】実施方法（A）では、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地に、AB10064株あるいはAB10253株を接種して好気的に培養し、得られた培養液中で該細菌をミオーイノシトールに作用させて、ミオーイノシトールをシロイノソースへ変換させ、これにより培養液中でシロイノソースを生成させかつ蓄積させ、そして培養液から菌体を除き、得られた

培養上清液で例えばイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、培養上清液からシロイノソースを回収する。

【0018】実施方法(B)は、上記AB10064株あるいはAB10253株をミオイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から菌体を除き、ここで得られた菌体或いはその破砕物を、ミオイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオイノシトールに作用させて前記の水溶液または緩衝液中でシロイノソースを生成せしめ、そして、生成したシロイノソースを例えばイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せにより回収する。

【0019】以下においては、第1の本発明の方法の実施方法(A)及び(B)をより詳しく説明する。実施方法(A)では、ミオイノシトールならびに炭素源及び窒素源を含む液体栄養培地に、AB10064株あるいはAB10253株を接種して好氣的に培養することにより、ミオイノシトールからシロイノソースを生成させ、蓄積させる。

【0020】用いる液体培地の組成は、目的を達成し得る限り何ら特別の制限はなく、シロイノソースへの変換原料であるミオイノシトールを含有しかつ更に炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよい。合成培地、天然培地のいずれも使用できる。液体培地はミオイノシトールを0.1%~40%、より好ましくは10%~30%含有し、炭素源として、グリセロール、シュクロース、マルトースあるいは澱粉を0%~20%、より好ましくは0%~5%含有し、窒素源として、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%~5.0%、好ましくは0.5%~2.0%含有することが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガ、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培地または培養液の水素イオン濃度をpH4~10、好ましくはpH5~9に調整して微生物を培養すると、ミオイノシトールを効率よくシロイノソースに変換することができる。

【0021】培養条件は、用いる培地の種類によっても異なる。培養温度は12~35℃、好ましくは20~27℃である。また、培養は液体培地を振盪したり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行うのがよい。培養時間は、培養液中のミオイノシトールが完全に消失し、且つ、シロイノソースが最大の蓄積量を示すまで行えばよく、通常1~10日、好ましくは3~8日である。

【0022】培養後に、培養液(物)から菌体を除き、その培養上清液から目的物を採取する方法としては、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用

することができる。すなわち、培養液から菌体を除去した後、培養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノソース以外の不純物をほとんど除くことができる。しかし、強塩基性陰イオン交換樹脂のOH⁻型はシロイノソースを化学変化させるので、使用することはできない。かくして、シロイノソースを含有する上澄液が得られる。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。

【0023】より具体的には、シロイノソースが蓄積した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)の充填カラムを通過させて通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ、洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併する。こうして合併された水溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)A368S(遊離塩基型)を充填したカラムを通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ、洗浄して洗浄液を集め、ここで得られた通過液及び洗浄液を合併して、シロイノソースを含みかつそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得するのが好ましい。この水溶液を濃縮して得られたシロイノソースの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なシロイノソースの結晶を晶出させることができる。

【0024】実施方法(B)では、AB10064株あるいはAB10253株を培養して得られた菌体を、あるいはその菌体の破砕物をミオイノシトールと緩衝液または液体培地中で反応させ、シロイノソースを生成させる。

【0025】菌体としては、実施方法(A)により得られた培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途、適当な培養条件で培養して得たものを用いてもよい。集菌すなわち、菌体の分離は、培養液から遠心分離、濾過等公知の方法により行えばよい。

【0026】得られた菌体または菌体破砕物をミオイノシトールと反応させる反応媒質としては、液体培地または緩衝液が用いられる。液体培地としては、実施方法(A)で用いたものと同様のものを用いてもよく、あるいは、別途、上記微生物を培養した液体培地をそのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド(Good's)のCHES緩衝液等を10~500mM、好ましくは20~100mMの濃度で用いればよい。溶液中のミオイノシトールの濃度は0.1~40%程度とするのが好ましい。

【0027】反応条件は、用いる菌株や培地、緩衝液の種類によって異なる。反応温度は5~60℃、好ましくは10~45℃であり、反応時間は1~50時間、好ましくは12~36時間であり、液体培地または緩衝液のpHは2~10、好

ましくは3〜9である。反応終了後の反応液からの目的物質を単離する方法は実施方法(A)と同様に行えばよい。

【0028】第2の本発明においては、第1の本発明の方法により培養液または水性媒質中でシロ-イノソースを生成させかつ蓄積させ、その生成されたシロ-イノソースを含む反応液または該水性媒質から、生成したシロ-イノソースを単離することなしに、該シロ-イノソースを含有する該反応液または水性媒質に適当な還元剤を添加して作用させ、シロ-イノソースを還元してシロ-イノシトルおよびミオ-イノシトルを生成させ、ついで、得られた還元反応液からシロ-イノシトルを回収することを特徴とする、シロ-イノシトルの製造方法が提供される。

【0029】第2の本発明方法は、具体的には以下に示す(C)、(D)の2つの実施方法で行うことができる。

【0030】実施方法(C)は、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を、ミオ-イノシトルを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオ-イノシトルに当該細菌を作用させて、ミオ-イノシトルをシロ-イノソースに変換することにより培養液中でシロ-イノソースを生成させかつ蓄積させ、ついで、得られた培養液から菌体を除去するがシロ-イノソースを単離することなしに、シロ-イノソースを含有する反応液(培養上清液)に還元剤を直接に添加して、該還元剤をシロ-イノソースに作用させてシロ-イノシトルおよびミオ-イノシトルを生成させ、そして、還元後の培養上清液(反応液)からシロ-イノシトルを回収する方法である。すなわち、実施方法(C)は、第1の本発明の実施方法

(A)により培養液中に生成させ、蓄積させたシロ-イノソースを、培養上清液から単離せずに、例えば水素化ホウ素アルカリ金属等の適当な還元剤で還元し、生成したシロ-イノシトル及びミオ-イノシトルの混合溶液から例えば活性炭処理、イオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、シロ-イノシトルを回収する方法である。

【0031】実施方法(D)は、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を、ミオ-イノシトルを含有する液体培地で培養し、得られた培養液から菌体を除去し、ここで得られた菌体或いはその破砕物を、ミオ-イノシトルを含む水溶液または緩衝液中でミオ-イノシトルと反応させ、前記の水溶液または緩衝液中でシロ-イノソースを生成せしめ、ここで得た反応液中に生成したシロ-イノソースを単離すること無しに、シロ-イノソースを含有する該反応液に還元剤を直接に添加し、該還元剤をシロ-イノソースに作用させてシロ-イノシトルおよびミオ-イノシトルを生成させ、そして生成したシロ-イノシトルを回収する方法である。すなわち、実施方法(D)は、AB10064株あるいはAB10253株を使用して、第1の本発明の実施方法(B)により得られたシロ

-イノソースを、単離せずに、例えば水素化ホウ素アルカリ金属等の適当な還元剤で還元し、シロ-イノソースから生成したシロ-イノシトル及びミオ-イノシトルの混合溶液から例えばイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、シロ-イノシトルを回収する方法である。

【0032】以下においては、第2の本発明方法の実施方法(C)及び(D)をより詳しく説明する。

【0033】実施方法(C)では、前記第1の本発明の実施方法(A)の方法で培養液中にシロ-イノソースを生成させかつ蓄積させた後、培養液から菌体を除去するがシロ-イノソースを単離せず、培養上清液に適当な還元剤を添加し、還元反応を行う。こうして得られた還元反応液中から生成されたシロ-イノシトルを取得する。すなわち、培養液から菌体を除去後、得られた培養上清液に直接に還元剤を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でシロ-イノソースからシロ-イノシトル及びミオ-イノシトルが生成される。使用される還元剤は、水系中でシロ-イノソースをシロ-イノシトルに還元できる還元剤であり、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアニ化水素化ホウ素ナトリウムであるのが望ましい。ここで得られた還元反応液からシロ-イノシトルを回収し、採取するには、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち還元反応液を、活性炭やイオン交換樹脂で処理することにより、シロ-イノシトル及びミオ-イノシトルを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を得る。この水溶液からシロ-イノシトルだけを取得するには、主に水に対する溶解度の差を利用することが有効である。すなわち、前記の水溶液を濃縮し、水に対する溶解度の低いシロ-イノシトルを固体として析出せしめこれを取得すればよい。

【0034】実施方法(C)の改良方法として、以下に記す方法はシロ-イノシトルを効率良く取得するのにきわめて有効である。すなわち、シロ-イノソースを適当な還元剤で還元した溶液中ではシロ-イノシトルの他にミオ-イノシトルも生成されるが、この溶液に対して、遠心分離等で除いておいたAB10064株あるいはAB10253株の菌体を再び添加し、反復回で培養を行うことになり、シロ-イノシトルには何の変化を与えずに、ミオ-イノシトルをシロ-イノソースへ再度変換させ、培養液中にシロ-イノシトルとシロ-イノソースを蓄積させる。この際、ミオ-イノシトルの適量を追加添加したり、また炭素源や窒素源を培養開始前に添加しても良い。こうして得られた培養液から菌体を除いた後、培養上清液に再び還元剤を添加することによりシロ-イノソースを還元して、還元反応液中にシロ-イノシトルを多量に生成させ蓄積させることが可能であること

が、本発明者らによって初めて明らかになった。この様にして得られた反応溶液からシロ-イノシトールを単離し、精製するには、前記した通常の手法を用いて実施することができる。本発明の方法は、AB10064株あるいはAB10253株が基質としてミオ-イノシトールを認識するがシロ-イノシトールは認識しないというAB10064株あるいはAB10253株の有するミオ-イノシトール酸化酵素の基質特異性を利用したもので、繰り返し実施することで生成シロ-イノシトールの蓄積量を更に高めることが出来る。

【0035】実施方法(D)では、液体栄養培地に、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を接種して好氣的に培養することにより、該菌体を取得し、こうして得られた該菌体を、緩衝液あるいは液体培地等の水性媒質中に溶解させたミオ-イノシトールに作用させて、シロ-イノソースを生成蓄積させ、シロ-イノソースを単離せず、適当な還元剤を添加し、還元反応を行い、こうして得られた還元反応液から、生成されたシロ-イノシトールを取得する。

【0036】この実施方法(D)で使用される菌体または菌体破砕物は、実施方法(B)と同様の手段で得ることができる。また、液体反応の方法も実施方法(B)と同様の手法で実施できる。シロ-イノソース含有反応液から遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体を除去した後、得られた菌体を除去された反応液(培養上清液)に還元剤として水素化合物を添加して、シロ-イノソース*

(B) 生理生化学的性状

(1) グラム染色:

(2) OFテスト:

(3) 好気条件での生育:

(4) 嫌気条件での生育:

(5) 生育温度:

4°C

9°C

12°C

16°C

20°C

34°C

38°C

43°C

(6) 食塩耐性:

0%

2%

5%

10%

(7) 生育pH:

pH4.0

pH5.0

pH6.0

pH7.0

*の還元反応を行い、これによりシロ-イノシトール及びミオ-イノシトールを生成させる。この還元反応は、実施方法(C)で説明したと同じ要領で行い得る。更に、シロ-イノシトール及びミオ-イノシトール含有の還元反応液からシロ-イノシトールを取得する方法は、先に実施方法(C)で説明した手法と同様に実施できる。

【0037】前述したようにミオ-イノシトールからシロ-イノソース生産する菌は多種存在するが、例えば本発明者らが神奈川県厚木市の土壌より分離したAB10064株あるいはAB10253株は本発明に最も有効に使用される菌株の例である。本菌株の菌学的性質を以下に示した。

【0038】なお、本菌株の同定の当たっては、「新細菌培地学講座」(第2版、近代出版)、「医学細菌同定の引き」(第2版、近代出版)、「細菌学実習提要」(丸善)に準じて実験を行い、実験結果を「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」VOL1(1984)を参考にして同定した。

【0039】AB10064株の菌学的諸性質を次に記載する。

20 (A) 形態的特徴

(1) 細胞形態: 桿菌で大きさは0.4~0.7×0.6~4.0μm。多形性がある。

【0040】(2) 運動性: + (懸滴法)

(3) 普通寒天培地上での生育: 生育は中程度。コロニー形態は円形、平滑で光沢を帯び、色調はクリーム色。

【0041】

-

O (Oxidative)

+

-

-

+

+

+

+

+

±

-

+

+

+

-

-

+

+

+

13

14

pH8.0	+
pH9.0	+
pH10.0	+

(8) 色素の産生:

マンニット酵母エキス寒天培地 (不溶性色素の検出)

なし

King培地B (水溶性色素の検出)

淡黄色の蛍光色素を産生する

(9) チトクロームオキシダーゼ:	+
(10) カタラーゼ:	+
(11) 硝酸塩還元性:	-
(12) 硫化水素産生:	-
(13) ゼラチンの液化:	-
(14) インドールの産生:	-
(15) マロン酸の利用性:	+
(16) ONPG分解性:	-
(17) エスクリンの分解性:	-
(18) クエン酸の利用性:	+
(19) デカルボキシラーゼ活性:	
L-リジン	-
L-アルギニン	+
L-オルニチン	-
(20) 尿素の分解性:	+
(21) アセトアミド分解性:	-
(22) 各種糖から酸の生成:	
D-グルコース	+
D-キシロース	+
D-マンノース	+
L-アラビノース	+
D-フルクトース	-
マルトース	-
L-ラムノース	-
マンニトール	-
シュークロース	-
アドニトール	-
ミオ-イノシトール	-
ゾルビトール	-
トレハロース	-
D-セロビオース	-
ズルシトール	-
グリセロール	+
ラクトース	-
メリビオース	+
ラフィノース	-
α-メチル-グルコース	-
サリシン	-
(23) 炭素源の資化性	
D-グルコース	+
D-フルクトース	+
L-アラビノース	+

D-キシロース	+
グリセロール	+
エタノール	+
ポリエチレングリコール	+
L-ヒスチジン	+
L-バリン	+
L-アルギニン	+
L-セリン	+
(24) V-Pテスト	-
(25) フェニルアラニンデアミナーゼ	-
(26) トリプトファンデアミナーゼ	-
(27) ユビキノンの分子種:	ユビキノ9 (Q9)
(28) DNAのGC含量:	62%

【0042】以上のとおり、AB10064株の主性状は、グラム陰性の桿菌で、大きさは0.4~0.7×0.6~4.0μmである。本菌株は生育適温12°C~34°Cの中温菌でpH4.0では生育しない。硝酸塩の還元性はなく、カタラーゼ及びオキシダーゼ陽性であり、グルコースを好氣的に分解し、酸を生成する。ユビキノンの分子種はQ9で、DNAのGC含量は62%であった。

【0043】これらの菌学的性質を総合して、本菌株はシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する菌株であると判断した。「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」Vol 1 (1984) 第141頁~第199頁によると、シュードモナス属細菌は30種以上の種 (species) が知られており、遺伝子的に幅のある分類群を形成している。

【0044】AB10064株の菌学的性状を上記の既知の種と比較検討した結果、AB10064株はシュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*) に最も近縁の種であると考えられた。しかし、本菌株の菌学的性質は炭素源の資化性等の結果が、シュードモナス・ブチダの性状と完全には一致しなかったため、本AB10064株を公知のものと区別するため、シュードモナス・エスピーAB10064株と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18330として寄託した (寄託日は平成13年5月17日)。

*【0045】シュードモナス属細菌では、シュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*) 及びシュードモナス・ベイジェリンキー (*Pseudomonas beijerinckii*) において、ミオ-イノシトールをシロ-イノソースへ酸化する活性を有していることが知られている。シュードモナス・ブチダの活性は文献によると、シロ-イノシトールをミオ-イノシトールの2倍の比率で酸化するという点で、AB10064株とは異なっている。また、同じくシュードモナス・ベイジェリンキーも同様な活性が報告されているが、AB10064株は前記した通りシュードモナス・ブチダに近縁な細菌であり、シュードモナス・ベイジニリンキーとは菌学的性質が大きく異なる。従って本発明で用いるシュードモナス・エスピーAB10064株の有するミオ-イノシトール酸化活性は全くの新知見であるといえる。

【0046】AB10253株の菌学的性質を次に記載する。

(a) 形態的特徴

- (1) 細胞形態: 球桿菌で大きさは0.5~0.8×0.6~16μm。多形性は無い
- (2) 運動性: - (懸滴法)
- (3) 普通寒天培地上での生育: 生育は極微。色調は黄土色~黄色

*

(b) 生理生化学的性状

(1) グラム染色:	- (一部variable)
(2) OFテスト:	O (Oxidative)
(3) 好気条件での生育:	+
(4) 嫌気条件での生育:	-
(5) 生育温度:	
10°C	-
12°C	±
15°C	+
35°C	+
38°C	+
42°C	±
(6) 食塩耐性:	
0%	+

17	
1%	+
2%	-
(7) グルコース耐性:	
10%	+
20%	+
30%	+
(8) エタノール耐性試験:	
1%	+
2%	+
5%	+
10%	+
(9) 生育pH:	
pH3.0	-
pH4.0	+
pH5.0	+
pH7.0	+
pH8.0	±
(10) 色素の産生:	
GYC培地 菌体周囲が黄土色～茶色に着色	
(11) チトクロームオキシダーゼ:	-
(12) カタラーゼ:	+
(13) 硝酸塩還元性:	-
(14) 硫化水素産生:	-
(15) ゼラチンの液化:	-
(16) インドールの産生:	-
(17) マロン酸の利用性:	-
(18) ONPG分解性:	-
(19) エスクリンの分解性:	+
(20) クエン酸の利用性:	-
(21) アルギニンヒドロラーゼ活性:	-
(22) 尿素の分解性:	-
(23) デオキシリボヌクレアーゼ活性:	+
(24) 各種糖から酸の生成:	
D-グルコース	+
D-キシロース	+
D-マンノース	+
L-アラビノース	+
D-フルクトース	-
ガラクトース	+
L-ラムノース	-
マンニトール	-
シュークロース	-
アドニトール	-
エリスリトール	-
アラビトール	-
ミオーイノシトール	+
ソルビトール	-
トレハロース	-
D-セロビオース	-
エタノール	+

グリセロール	+
ラクトース	-
リボース	+
ラフィノース	-
プロピレングリコール	-
β -ヒドロキシブチレート	-
α -メチルグルコース	-

(25) 炭素源の資化性

D-グルコース	+
ガラクトース	-
L-アラビノース	-
D-キシロース	-
グリセロール	+
ミオ-イノシトール	+
シュークロース	-
L-ヒスチジン	-
レバリン	-
L-アルギニン	-
L-セリン	-

(26) ユビキノンの分子種： ユビキノン9 (Q9)

(27) DNAのGC含量： 58%

【0047】以上のとおり、AB10253株の主性状は、グラム陰性の球桿菌で、大きさは0.5~0.8×0.6~1.6 μ m。生育適温は30°C~34°Cの中温菌で至適生育pHはpH5。硝酸塩の還元性は無く、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、30%グルコース培地で好氣的に生育する。ユビキノンの分子種はQ9で、DNAのGC含量は58%であった。

【0048】これらの菌学的性質を総合して、本菌株はアセトバクター (Acetobacter) 属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL.1 (1984) 268頁~274頁によると、アセトバクター属はアセトバクター・アセティ (Acetobacter aceti)、アセトバクター・リケファシエンシス (Acetobacter liquefaciens)、アセトバクター・パステウリアヌス (Acetocacter pasteurianus)、アセトバクター・ハンセニー (Acetobacter hansenii) の4つの種 (species) から構成されている。AB10253株の菌学的性状を上記の既知の種と比較検討した結果、AB10253株はアセトバクター・アセティ (Acetobacter aceti) に最も近縁の種であると考えられた。しかし、高濃度のグルコース及びエタノールに対して耐性である点、生育温度において38°Cでも生育する点、可溶性色素を産生する点など本菌株の有するいくつかの菌学的性質において、アセトバクター・アセティの性状とは一致しなかったため、本AB10253株を公知のものと区別するため、アセトバクター・エスピーAB10253株と命名し、産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18868として寄託した (寄託日は平成14年5月27日)。

【0049】本明細書で先に記したように、1960年代ま

ではアセトバクター属細菌とグルコノバクター属細菌は分類学的な境界が曖昧であり、本来はグルコノバクター属である微生物がアセトバクター属と同定され発表されていた。従ってアセトバクター属細菌によるミオ-イノシトール酸化活性は、本発明で開示したAB10253株が初めての発見である。

【0050】

【発明の効果】本発明の方法によれば、医農薬合成原料として有用な、純度の高いシロ-イノソースと、医薬及び医農薬合成原料として有用なシロ-イノシトールとを工業的生産レベルで安価に製造することができる。

【0051】

【発明の実施の形態】以下に本発明の実施例を説明する。

実施例1

実施方法 (A) によるシロ-イノソースの製造例

(1) シロ-イノソースの生成

ミオ-イノシトール12.0%、酵母エキス1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含む液体培地3リットルを、100 mlずつ500 ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。滅菌された液体培地を含む各々の三角フラスコにシュドモナス・エスピーAB10064株 (FERM P-18330) のスラント培養物を1白金耳接種し、27°Cで4日間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離 (8,000rpm 20分間) し、上清を培養上清液 (2900 ml) として得た。

【0052】この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはシロ-イノソースが98mg/mlの濃度で生成して

いることがわかった(収量284g、ミオーイノシトールからの変換率80%)。この時の培養液中にミオーイノシトールは検出されなかった。

【0053】高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム: Wakosil 5NH₂ (4.6×250mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RIDETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量: 20μl

溶媒: アセトニトリル-水=4:1

流量: 2 ml/min

溶出時間シロ-イノソース: 11.6分

なお、上記のシロ-イノソースの変換率は、次式により求めた。

変換率(%) = [培養上清液中のシロ-イノソースのモル数 ÷ 培地中のミオーイノシトールのモル数] × 100

【0054】(2) シロ-イノソースの単離

実施例1(1)で得た培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H型)500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ40cm)を通過させ、その後、このカラムに500mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。ここで得られたカラム通過液及び洗浄液を合併し、合併した水溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)368S(遊離塩基型)1000mlを充填したカラム(内径7cm、長さ40cm)を通過させ、その後、このカラムに1000mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併した水溶液中には上記シロ-イノソースが含まれ、それ以外の不純物はほとんど存在していなかった。

【0055】上記により得たシロ-イノソース水溶液を減圧下で約700mlまで濃縮し、エタノールを3倍量加え5°Cで一晩放置したところ、純粋なシロ-イノソースの精製品の無色結晶216gが得られた。この時の精製回収率は76%で、ミオーイノシトールからのシロ-イノソースの通算率は61%であった。

【0056】なお、上記シロ-イノソースの精製回収率は次式により求めた；

精製回収率(%) = [精製単離したシロ-イノソースの量 ÷ 培養上清液中の精製前のシロ-イノソースの量] × 100

また、上記シロ-イノソースの全回収率は次式により求めた；

全回収率(%) = [精製単離したシロ-イノソースのモル数 ÷ 培地中に添加したミオーイノシトールのモル数] × 100

【0057】実施例2

実施方法(B)によるシロ-イノソースの製造例

(1) 菌体の生産

ミオーイノシトール 0.5%、(NH₄)₂SO₄ 0.1%、K₂HPO₄ 0.7%、KH₂PO₄ 0.2%、MgSO₄・7H₂O 0.01%を含むpH7の

液体培地2リットルを500ml容のバッフル付き三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。滅菌された液体培地を含む各々の三角フラスコにシュドモナス・エスビーAB10064株を接種し、27°Cで3日間振盪培養した。培養液を遠心分離して得られた菌体を、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)200mlで洗浄後、再度遠心分離し、洗浄菌体を得た。

【0058】(2) シロ-イノソースの製造

上記により得られた洗浄菌体30gを、溶解されたミオーイノシトール 4.0gを含有した0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)400ml(ミオーイノシトール濃度10mg/ml)に加え、得られた混合物を30°Cで、24時間、緩やかにスターラーで攪拌しながら菌体をミオーイノシトールに作用させて反応させた。反応終了後、得られた反応液から菌体を除き、その反応液濾液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ、シロ-イノソースが8mg/mlの濃度(変換率82%)で蓄積していた。反応液濾液からのシロ-イノソースの回収と単離は、実施例1に記載した方法に準じて行い、シロ-イノソース2.5gを結晶として得た(精製回収率78%)。また、上記シロ-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は64%であった。

【0059】なお、上記のシロ-イノソースの変換率は、実施例1に準じて求め、精製回収率は次式により求めた；

精製回収率(%) = [精製単離したシロ-イノソースの量 ÷ 反応液中の精製前のシロ-イノソースの量] × 100

また、上記シロ-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は次式により求めた；

全回収率(%) = [精製単離したシロ-イノソースのモル数 ÷ 緩衝液中に添加したミオーイノシトールのモル数] × 100

【0060】実施例3

実施方法(C)によるシロ-イノシトールの製造例の1

(1) シロ-イノソースの生成

実施例1の(1)と全く同様の方法でAB10064株を3リットルの培地で培養し、培養液を遠心分離して菌体を取り除いた。シロ-イノソースを含有した培養上清液2900mlを得た。この培養上清液を実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析すると、培養上清液中にはシロ-イノソースが286g(ミオーイノシトールからシロ-イノソースへの変換率は80%)生成していることがわかった。

【0061】変換率(%) = [培養上清液中のシロ-イノソースのモル数 ÷ 培地中のミオーイノシトールのモル数] × 100

【0062】(2) シロ-イノソースの還元とシロ-イノシトールの生成

前項(1)で得たシロ-イノソース含有培養上清液の2900mlに水素化ホウ素ナトリウム 15.3gを徐々に加え、還元反応を実施した。還元終了後、培養上清液(すなわち

還元反応液)を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、その還元反応液(培養上清液)中には、シロ-イノシトールが105g存在し、副生成物として、ミオ-イノシトールを151g含有していることがわかった(シロ-イノシトールとミオ-イノシトールの合計反応率は89%：計算式は下記に示す)。シロ-イノソースからのシロ-イノシトールの反応率は36%であった。なお、高速液体クロマトグラフィーにおける、各化合物の溶出時間は以下の通りである。

溶出時間：ミオ-イノシトール 17.0分、シロ-イノシトール 17.7分

【0063】シロ-イノシトールとミオ-イノシトールの合計反応率(%) = [還元反応後の培養上清液中のシロ-イノシトールのモル数とミオ-イノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中のシロ-イノソースのモル数] × 100

【0064】また、上記のシロ-イノソースからのシロ-イノシトールの反応率は次式により求めた：

反応率(%) = [還元反応後の培養上清液中のシロ-イノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液中のシロ-イノソースのモル数] × 100

【0065】(3) シロ-イノシトールの単離

前項(2)で得た還元反応液を強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)400mlを充填したカラム(内径5cm、長さ40cm)に通過させ、その後、このカラムに400mlのイオン交換水を通して洗浄した。ここで得られたカラム通過液及び洗浄液を合併し、合併した水溶液を強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH⁻型)800mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)を通して、その後、このカラムに800mlのイオン交換水を通して洗浄した。

【0066】こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液は、シロ-イノシトールと副生成物であるミオ-イノシトールを含有するが、これら以外の不純物をほとんど含有しなかった。この水溶液を減圧下で濃縮すると、水溶解度の低いシロ-イノシトールのみが濃縮液中に析出した。500mlまで濃縮し、析出した結晶を濾過操作により取得した。このようにして得られた結晶(79g)の一部を水に溶解して、実施例1に記した方法による液体クロマトグラフィー及び他の分析装置で分析すると、この結晶はミオ-イノシトールを僅かに含有するシロ-イノシトールの結晶であることが判った。続いて、この結晶を全て4リットルの水に溶解し、ガラスフィルターで濾過した後、再度400mlまで濃縮した。ここで析出した結晶を取得し、60gの白色結晶を得た。この結晶を液体クロマトグラフィー及びその他の分析装置で分析すると純粋なシロ-イノシトールであることが判明した。

【0067】以上の一連の操作での、シロ-イノシトール

ルの精製回収率は57%、ミオ-イノシトールからのシロ-イノシトールの全回収率は17%であった。

【0068】なお、上記シロ-イノシトールの精製回収率は次式により求めた：

精製回収率(%) = [結晶として単離したシロ-イノシトールの量 ÷ 還元反応後の上清液中のシロ-イノシトールの量] × 100

また、上記シロ-イノシトールのミオ-イノシトールからの全回収率は次式により求めた：

10 全回収率(%) = [結晶として単離したシロ-イノシトールの量 ÷ 培地中に添加したミオ-イノシトールの量] × 100

【0069】実施例4

実施方法(c)によるシロ-イノシトールの製造例の2

(1) シロ-イノソースの生成と還元

実施例3の(1)と全く同様の方法でAB10064株を培養した。培養上清液中に生成したシロ-イノソースを実施例3の(2)と同様の方法で還元し、シロ-イノシトール(105g)とミオ-イノシトール(152g)を含有する混合溶液(2900ml)を得た。この溶液に、遠心分離により分取されたAB10064株の菌体と酵母エキス(6g)を添加した。得られた混合溶液を5L容ジャーフェメンターに装入して、培養温度27°C、攪拌回転数400rpm、通気量1vvmで3日間培養を行った。培養液を分析した結果、前記混合溶液中のミオ-イノシトールはシロ-イノソースに変換されていた。かくしてシロ-イノソース(122g)及びシロ-イノシトール(105g)と菌体を含有する混合溶液を得た。

30 【0070】この混合溶液から菌体を遠心分離により除き、得られた溶液(培養上清液)に水素化ホウ素ナトリウム6.5gを徐々に加えて還元反応を実施した。その結果、還元反応後の反応溶液(培養上清液)中にはシロ-イノシトールが162g存在し、更に副生物として、ミオ-イノシトールが66g含有されていることがわかった。最終的にミオ-イノシトールからのシロ-イノシトール変換率は45%であった。

【0071】(2) シロ-イノシトールの単離

40 実施例3の(3)と同じ手法で還元反応液からシロ-イノシトールの単離を行った。即ちイオン交換樹脂による脱塩の後、溶液を約900mlに濃縮し、シロ-イノシトールの結晶を析出させ、この結晶を濾過することにより単離した。こうして取得したシロ-イノシトールの粗結晶を再度8リットルの水に溶解し、得られた水溶液からガラスフィルターで水不溶物を除去し、ついで減圧下濃縮した。水溶液を約800mlに濃縮した後、析出したシロ-イノシトールをガラスフィルターで濾過し、白色結晶(123g)として回収した。ミオ-イノシトールからの全回収率は34%であった。

全回収率(%) = [結晶として単離したシロ-イノシトールの量 ÷ 培地中に添加したミオ-イノシトールの量]

×100

【0072】実施例5

実施方法(C)によるシロ-イノシトールの製造例の3

(1) シロ-イノソースの生成と還元

実施例4の(1)と全く同様の方法でAB10064株の培養、培養上清液の還元、還元反応液の再培養及び2度目の培養上清液の再還元を実施した。こうして得られた還元反応後の反応溶液(培養上清液)にはシロ-イノシトールが160g存在し、副生物として、ミオ-イノシトール65gが含有されていた。この混合溶液に再度、遠心分離して分取されておいたAB10064株の菌体と酵母エキス(2.5g)を添加した。得られた混合液を5L容ジャーファーマンターに装入し、培養温度27℃、攪拌回転数400rpm、通気量1vvmで3日間培養を行った。培養液を分析した結果、前記混合液中のミオ-イノシトールはシロ-イノソースに変換されていた。かくして、シロ-イノソース(52g)及びシロ-イノシトール(160g)と菌体を含む混合溶液を得た。

【0073】この混合溶液から菌体を遠心分離により除き、得られた上清溶液に水素化ホウ素ナトリウム2.8gを徐々に加えて還元反応を実施した。還元反応後の反応溶液(培養上清液)にはシロ-イノシトールが180g存在し、副生物として、ミオ-イノシトール26gが含有されていることがわかった。最終的にミオ-イノシトールからのシロ-イノシトール変換率は50%であった。

【0074】(2) シロ-イノシトールの単離

実施例4の(2)と同じ手法でシロ-イノシトールの単離を行った。即ちイオン交換樹脂による脱塩の後、溶液を約900mlに濃縮し、シロ-イノシトールの結晶を析出させ、この結晶を濾過することにより単離した。こうして取得したシロ-イノシトールの粗結晶を再度8リットルの水に溶解し、得られた溶液を減圧下で濃縮した。約800mlに濃縮し、その結果析出したシロ-イノシトールをグラスフィルターで濾過し、白色結晶(140g)として得た。ミオ-イノシトールからの全回収率は39%であった。

【0075】実施例6

実施方法(D)によるシロ-イノシトールの製造例

実施例2と全く同様の方法で、AB10064株の洗浄菌体によるミオ-イノシトールの酸化でシロ-イノソースの製造を行った。すなわちミオ-イノシトール4.0gを含有する0.05M リン酸緩衝液(pH7.0)400ml(ミオ-イノシトール濃度10mg/ml)中にAB10064株の洗浄菌体30gを加え、得られた混合物を30℃で24時間緩やかにスターラーで攪拌しながら菌体をミオ-イノシトールと反応させて、反応溶液中にシロ-イノソースを8mg/mlの濃度で蓄積させた。反応液を遠心分離して菌体を除き、得られた溶液(上清液)に水素化ホウ素ナトリウム170mgを徐々に加えて還元反応を実施した。その結果、反応液中にはシロ-イノシトールが1250mg存在し、副生物としてミオ-イ

ノシトール1600mgが含有されていた。

【0076】実施例3の(3)と同様の手法でシロ-イノシトールの単離を行い、シロ-イノシトールの白色結晶800mgを得た。ミオ-イノシトールからの全回収率は20%であった。

【0077】実施例7

実施方法(C)によるシロ-イノシトールの製造例の4

(1) シロ-イノソースの生成

ミオ-イノシトール 16.0%、酵母エキス 16%を含む液体培地3リットルをpH5.0に調整し、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレブ滅菌した。各々の三角フラスコにアセトバクター・エスピーAB10253株(FERM P-18868)のスラント培養物を1白金耳接種し、27℃で4日間振盪培養した。培養液を遠心分離(8,000rpm 20分間)して菌体を除き、上清を培養上清液(2900ml)とした。遠心分離により得られた培養菌体は4℃で冷蔵保存した。この培養上清液を実施例1と同様の方法で分析した。その結果培養上清液中にはシロ-イノソースが153mg/ml(459g、変換率97%)生成していることがわかった。この時の培養液中にミオ-イノシトールは検出されなかった。

【0078】(2) 培養上清液の還元

前項(1)で得たシロ-イノソース含有の培養上清液の2900mlに水素化ホウ素ナトリウム30.6gを徐々に加え、還元反応を実施した。還元終了後、培養上清(反応液)を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応後の反応液中(培養上清液)には、シロ-イノシトールが177g存在し、副生成物として、ミオ-イノシトールを252g含有していることがわかった。

【0079】(3) シロ-イノシトール粗結晶の単離と、菌体反応によるシロ-イノソースの生成

前項(2)で得た還元反応後の反応液を一晩、室温に静置して置くとシロ-イノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で99g得られた。ろ液は再度反応させるためにミオ-イノシトールの228gを追加し溶解させた後に、5N HClでpH5.0に調整した。これに前項(1)で分離されて保存しておいた培養菌体を懸濁し、約100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注した。

【0080】菌体反応は純酸素ガスを三角フラスコ内の混合液に通気し、27℃で20時間、ロータリーシェーカーで反応させた。反応終了後、反応溶液を遠心分離(8,000rpm 20分間)し、上清を菌体反応上清液(3050ml)とした。遠心分離により得られた培養菌体は4℃で冷蔵保存した。

【0081】(4) 菌体反応上清液の還元

前項(3)で得たシロ-イノソース含有の培養上清液の3050mlに水素化ホウ素ナトリウム31.1gを徐々に加え、

に還元反応を実施した。還元終了後、菌体反応上清液（還元反応液）を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応後の反応液中には、シロ-イノシトールが258g存在し、副生成物として、ミオ-イノシトールを256g含有していることがわかった。

【0082】(5) シロ-イノシトール粗結晶の単離と菌体再反応によるシロ-イノソースの生成
前記(4)で得た還元反応後の反応液を一晩、室温に静置して置くとシロ-イノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で199g得られた。ろ液は再度反応させるためにミオ-イノシトールの224gを追加し溶解させた後に、5N HClでpH5.0に調整した。これに前項(3)で分離され保存しておいた培養菌体を懸濁し、約100 mlずつ500 ml容のバフフル付き三角フラスコに分注した。菌体反応は純酸素ガスを三角フラスコ内の混合液に通気し、27℃で20時間、ロータリーシェーカーで反応させた。菌体との再反応終了後、生成したシロ-イノソースを含有した培養液を遠心分離（8,000rpm 20分間）して菌体を除去し、上清を菌体再反応後の培養上清液（3170 ml）とした。遠心分離により得られた培養菌体は4℃で冷蔵保存した。

【0083】(6) 菌体反応後の培養上清液の還元
前項(5)で得たシロ-イノソース含有の培養上清液の3170 mlに水素化ホウ素ナトリウム31.1gを徐々に加えた後に還元反応を実施した。還元終了後、ここで得た還元反応液を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応液中（培養上清液）には、シロ-イノシトールが268g存在し、副生成物として、ミオ-イノシトールを253g含有していることがわかった。

【0084】(7) シロ-イノシトール粗結晶の単離 *

* 前項(6)で得た還元反応液を一晩、室温に静置して置くとシロ-イノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で197g得られた。この白色沈殿物と、前項(3)と(5)で得られた白色沈殿物を合わせて、シロ-イノシトールを含有する白色沈殿物を合計495g（99+199+197）得た。また、ここまでの反応に要したミオ-イノシトールは932g（480+228+224）であった。

【0085】(8) シロ-イノシトールの精製と単離
これまでに得られた白色沈殿物487gを熱水25Lに溶解させた後、室温まで冷却し、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）C-20（H⁺型）400 mlを充填したカラム（内径5cm、長さ40cm）に通過させ、その後このカラムに400 mlのイオン交換水を通して洗浄した。この通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）A-113（OH⁻型）800 mlを充填したカラム（内径5cm、長さ60cm）に通過させ、その後このカラムに800 mlのイオン交換水を通して洗浄した。

【0086】こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液は、シロ-イノシトールと副生成物であるミオ-イノシトールを含有するが、これら以外の不純物をほとんど含有しなかった。この水溶液を減圧下で濃縮すると、水溶解度の低いシロ-イノシトールのみが濃縮液中に析出した。500 mlまで濃縮し、析出した結晶を濾過操作により取得した。このようにして得られた結晶（421g）の一部を水に溶解して実施例1に記した方法による液体クロマトグラフィー及び他の分析装置で分析すると、ミオ-イノシトールを含有しない純粋なシロ-イノシトールの結晶であった。以上の一連の操作での、ミオ-イノシトールからのシロ-イノシトールの全収率は45%（421/932×100）であった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチコード（参考）
//(C 1 2 N 1/20		C 1 2 R 1:38	
C 1 2 R 1:38)		1:02	
(C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:02)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:38)			
(C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:02)			
(C 1 2 P 7/26			
C 1 2 R 1:38)			
(C 1 2 P 7/26			
C 1 2 R 1:02)			

(72)発明者 北 雄一

神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚
木寮

(72)発明者 山口 将憲

神奈川県座間市立野台1丁目4番6号 サ
ンライズ立野台101

(72)発明者 玉村 健

神奈川県大和市中央林間5丁目18番4号

(72)発明者 森 哲也

神奈川県高座郡寒川町倉見3830-6 シテ
ィクラミ311号室

Fターム(参考) 4B064 AC05 AC31 CA02 CB13 CB18

CC03 CD02 CD10 DA01

4B065 AA02X AA41X AC14 BB06

BD22 CA07 CA09 CA44

4H006 AA02 AC41 BE23 FC22 FE12